

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-151900

⑤ Int.Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)6月28日

C 12 Q 1/68

A

6807-4B

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全7頁)

⑭ 発明の名称 核酸の検出方法

⑰ 特 願 平1-291558

⑱ 出 願 平1(1989)11月9日

⑲ 発 明 者	加 藤 欽 也	東京都大田区下丸子3丁目30番2号	キャノン株式会社内
⑲ 発 明 者	山 本 伸 子	東京都大田区下丸子3丁目30番2号	キャノン株式会社内
⑲ 発 明 者	岩 下 晴 美	東京都大田区下丸子3丁目30番2号	キャノン株式会社内
⑲ 発 明 者	桜 永 昌 徳	東京都大田区下丸子3丁目30番2号	キャノン株式会社内
⑰ 出 願 人	キャノン株式会社	東京都大田区下丸子3丁目30番2号	
⑲ 代 理 人	弁理士 若 林 忠		

明 細 書

1. 発明の名称

核酸の検出方法

2. 特許請求の範囲

1) 被検出核酸を含む試料と、

プローブ核酸と、

固相に結合された部分と、プローブ核酸とハイブリダイズする部分とを有する固定化用核酸を用い、

a) 被検出核酸・プローブ核酸・固定化核酸ハイブリッドを形成する過程と、

b) 固相に結合されたハイブリッドを標識を利用して被検出核酸・プローブ核酸ハイブリッドの形成の有無を検出する過程と

を含むことを特徴とする核酸の検出方法。

2) 被検出核酸とプローブ核酸との二本鎖形成部に選択的に標識を施す請求項1に記載の核酸の検出方法、

3) 被検出核酸、プローブ核酸及び固定化用核酸を同時に反応させる請求項1に記載の核酸の検出

方法。

4) 被検出核酸とプローブ核酸を反応させ、得られた反応混合物に固定化用核酸を反応させる請求項1に記載の核酸の検出方法。

5) プローブ核酸と固定化用核酸とを反応させ、得られた反応混合物に被検出核酸を反応させる請求項1に記載の核酸の検出方法。

6) 被検出核酸・プローブ核酸ハイブリッドを固定化用核酸より解離する過程を有する請求項1に記載の核酸の検出方法。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は核酸のハイブリッド形成反応を利用した核酸の検出方法に関する。

[従来の技術]

試料中に検出対象としての核酸(被検出核酸)が存在するか否かを検出するための方法として種々の方法が知られている。

例えば、固相に固定した試料に標識化プローブ核酸を反応させ、固相上での被検出核酸・プロー

プローブ核酸ハイブリッドの形成の有無をプローブ核酸に施した標識により検出する方法、液相中で試料とプローブ核酸を反応させ、得られた反応混合物中への被検出核酸・プローブ核酸ハイブリッドの形成の有無を検出する方法がある。

前者の方法の一例では、まず試料を電気泳動で分画し、プロットングすることによりニトロセルロースフィルターに試料の電気泳動パターンのレプリカを形成し、このレプリカに放射性プローブ核酸を反応させる。その際、試料中に被検出核酸が存在する場合には、被検出核酸と放射性プローブ核酸との間にハイブリッドが形成される。その後ハイブリダイズしなかった放射性プローブ核酸を洗浄、除去したのち、ニトロセルロースフィルター上に形成されたハイブリッドの放射性標識領域をオートラジオグラフィーなどによって検出する。

後者の方法の一例においては、溶液中で試料と放射性プローブ核酸とを反応させ、試料中に被検出核酸が含まれている場合に形成されるハイブ

リッドと未反応物とをカラム処理により分離し、形成されたハイブリッド中の放射性同位元素の標識活性を測定することで検出を行っている。

また、カラムにプローブ核酸を固定し、試料を流して反応させ、その後形成されたハイブリッドを抽出したのち1本鎖に解離し、それを集めて検出する方法もある。

〔発明が解決しようとする課題〕

前述の固相に固定した試料を用いる方法では、試料を大量に浪費したり検出操作に時間がかかるうえ、固相の調製が複雑で多くの工程を要するという欠点がある。

また、液相で試料とプローブ核酸を反応させ、生成したハイブリッドと未反応物とをカラム処理により分離する方法においては、被検出核酸のヌクレオチド鎖が比較的短い場合、カラム処理による分離精度が悪くなるという欠点がある。

また、カラムに固定したプローブ核酸を用いる方法では、カラムが特定の用途、すなわち、特定の核酸塩基配列を検出する場合にしか用いること

ができず汎用性に欠ける。また、複数の核酸塩基配列の検出を行う場合には、それぞれの塩基配列に対応するプローブ核酸を作成し個別のカラムに固定化を行わなければならないという問題がある。

本発明はハイブリダイゼーション法を利用する従来の各種検出方法における問題点を解決するために鋭意検討した結果なされたものであり、特定の検出対象としての核酸の存在を速やかにかつ簡便に検出できる方法を提供することを目的とする。

〔課題を解決するための手段〕

本発明の検出方法は、

被検出核酸を含む試料と、

プローブ核酸と、

固相に結合された部分と、プローブ核酸とハイブリダイズする部分とを有する固定化用核酸を用い、

a) 被検出核酸・プローブ核酸・固定化用核酸ハイブリッドを形成する過程と、

b) 固相に結合されたハイブリッド標識を利用して被検出核酸・プローブ核酸ハイブリッドの形成の有無を検出する過程と

固定化用核酸を利用して得る過程と

を含むことを特徴とする。

本発明は生体由来するDNAや遺伝子操作によって得られるDNAなど各種核酸の検出に利用でき、検出対象となる被検出核酸の種類は限定されない。

プローブ核酸としては、被検出核酸及び固定化用核酸と特異的にハイブリダイズできる塩基配列を有する核酸であればどのようなものでも利用できるが、合成機で手軽に合成できる比較的短いヌクレオチド鎖長のオリゴヌクレオチドが利用しやすい。

プローブ核酸のヌクレオチド鎖長は、被検出核酸のヌクレオチド鎖長の1/10以下とするのが好ましい。

なお、本発明において、プローブ核酸と被検出核酸との二本鎖形成部に標識を施す場合、プロー

プローブ核酸自体に標識化に必要な要件が要求されない。

例えば、ニックトランスレーション法や標識酵素の結合法を用いる標識では、標識される核酸がある程度以上のヌクレオチド鎖長を有する必要があるが、本発明で利用するプローブ核酸にはこのような要件は要求されない。

従って、入手（調製）し易く、かつ上述のように高感度な検出を実現し得る短いヌクレオチド鎖長のものがプローブ核酸として利用できるようになる。

しかしながら、本発明において被検出核酸とプローブ核酸の二本鎖形成部に標識が施される場合、プローブ核酸の相成やヌクレオチド鎖長を、該二本鎖形成部の標識化が容易であるように選択することが望ましい。

例えば、後述するような、被検出核酸とプローブ核酸の二本鎖形成部の一方のヌクレオチド鎖をプライマーとして利用し、その末端からヌクレオチド鎖を伸展させ、その伸展部分に標識物質を取

り込ませる方法による標識化方法で、プローブ核酸をプライマーとして利用する場合、該二本鎖形成部が、プローブ核酸とハイブリダイズした被検出核酸のヌクレオチド鎖がプライマー端部の伸展の際の鋳型として機能できるような相成、すなわちプローブ核酸の末端伸展方向に被検出核酸のヌクレオチド鎖が一本鎖の状態で存在する相成を有している必要がある。

従って、このようなプローブ核酸をプライマーとして利用する場合においては、プローブ核酸の相成やヌクレオチド鎖長を、形成される二本鎖形成部の相違を考慮して決定するのが望ましい。

なお、場合によっては試料核酸をプライマーとして利用するものであっても良い。

プローブ核酸の相成としては、例えば5'末端側に固定化用核酸とハイブリダイズできるB部分を、かつ3'末端側に被検出核酸とハイブリダイズできるA部分をそれぞれ有し、例えば第1図に示すような各核酸の連結相違を形成できるものを

挙げることができる。

固定化用核酸としては、プローブ核酸とハイブリダイズできる塩基配列を有し、かつ固相と結合し得る核酸であればどのようなものでも利用できるが、プローブ核酸と同様に合成機で手曜に合成できるヌクレオチド鎖を有するものが利用し易い。この固定化用核酸の鎖長もプローブ核酸の相成やヌクレオチド鎖長を考慮して決定するのが望ましい。なお、プローブ核酸とハイブリダイズした固定化用核酸に解離処理を行い固定化用核酸を再利用したい場合は、解離操作を考慮した相成を有する固定化用核酸を用いるとよい。

固定化用核酸の固相への固定のための相成としては、後述する固相に固定化されている物質と選択特異的に結合する物質を導入した相成が利用できる。例えば、固相に固定化されている物質としてアビジン、それに選択特異的に結合し、かつヌクレオチド鎖に結合可能な物質としてビオチンがあげられるが、この両物質については選択特異的に結合し、かつ固定化用核酸のヌクレオチド鎖、

固相に導入できるものであれば、どのようなものでも利用可能である。

試料と、プローブ核酸及び固定化用核酸とのハイブリダイゼーションは、常法に従って行なうことができる。

なお、ハイブリッド形成反応の条件は、用いられるプローブ核酸、固定化用核酸の有するヌクレオチド鎖長や塩基配列などによって異なるので、ハイブリダイゼーションにおける操作条件は所望とする目的に応じて最適条件を適宜選択すると良い。

このハイブリッド形成反応は、一般的には、ホルムアミド、適当な塩及びDenhardt溶液を含むハイブリダイゼーション溶液中で、温度をコントロールして行うことができる。

固定化用核酸の固定化には、固定化用核酸の有する固定用の特定物質に選択特異的に結合する物質を各相ゲル、ニトロセルロース等の担体に物理的あるいは化学的に結合させ、その後選択特異的に結合する物質間に反応を生じさせる方法が利用

できる。

本発明の方法においては、試料とプローブ核酸を反応させ、その結果形成されたハイブリッドに選択的に標識が施される。

この標識化の方法としては、例えばハイブリッドの二本鎖形成部を構成する鎖の一方をプライマーとして利用し、その末端を伸展させて1本鎖部分を2本鎖化する際に、その新たに合成される伸展部分に標識物質を取り込ませる方法等が利用できる。

本発明の方法の上記過程aは、例えば試料とプローブ核酸とをプローブ核酸のA部分と被検出核酸とでの二本鎖形成に必要な条件下で反応させた後、得られた反応混合物に固定化用核酸をプローブ核酸のB部分と固定化用核酸とでの二本鎖形成に必要な条件で反応させることにより行なうことができる。

この操作により、試料中に被検出核酸が含まれている場合には、例えば第1図に示すような被検出核酸1・プローブ核酸2・固定化用核酸3ハイ

ブリッドも固定化用核酸を介して固相に固定され、例えば第2図のような固定相5への固定状態が得られる。

また、固定化用核酸の固相への固定のための処理を、二本鎖形成のための反応の前に導入することにより行なうこともできる。その具体的な方法としては、固相に固定された固定化用核酸に、試料及びプローブ核酸を同時に反応させる方法、固相に固定された固定化用核酸に、プローブ核酸を反応させ次いで試料を反応させる方法、試料とプローブ核酸を反応させ、得られた反応混合物を固相に固定された固定化用核酸と反応させる方法、固定化用核酸とプローブ核酸を反応させ、得られた固定化用核酸-プローブ核酸ハイブリッドを固相に固定した後、該ハイブリッドに試料を反応させる方法がある。

本発明の方法における上記過程bは、例えば被検出核酸とプローブ核酸とのハイブリッドに選択的に標識を施し、それを用いた標識に応じた方法で検出することにより行なうことができる。

ブリッドが形成される。

このハイブリッド形成反応には、試料とプローブ核酸及び固定化用核酸とを同時にハイブリダイゼーション溶液中で反応させる方法、試料とプローブ核酸とをハイブリダイゼーションさせ、得られた反応混合物に固定化用核酸をハイブリダイゼーションさせる方法、プローブ核酸と固定化用核酸をハイブリダイゼーションさせ、得られた反応混合物に試料をハイブリダイゼーションさせる方法等が利用できる。上記において、固定化用核酸は固相に固定化されている場合もある。

すなわち、まずプローブ核酸と固定化用核酸とを反応させ、次いで得られた反応混合物と試料とを反応させても良い。

本発明は、例えば過程aを液相中で行ない、得られた反応混合物に該反応混合物に含まれる固定化用核酸の固相への固定に必要な処理を行なうことにより行なうことができる。この際、該反応混合物に被検出核酸・プローブ核酸・固定化用核酸ハイブリッドが形成されている場合には、このハ

この標識化には、前述したように二本鎖形成部の一方の鎖をプライマーとし、他の鎖を鋳型として利用して、プライマーとなる鎖の末端を伸展させる際に、新たに形成させる伸展部に標識を取り込ませる方法が利用できる。

第2図にプローブ核酸のA部分を構成する3'末端部をプライマーとして利用する場合を示す。

具体的には、例えば、プライマー末端の伸展に必要なdATP、dCTP、dGTP、dTTPなどのヌクレオチドと標識化すべきハイブリッドとをヌクレオチド鎖形成用の酵素の存在下で反応させ、その際に用いるヌクレオチドの1を鋳型に標識化ヌクレオチドを用いて、新たに形成されるヌクレオチド鎖に標識を取り込ませる方法等を利用できる。

この標識化ヌクレオチドとしては、一般にプローブの標識に利用されている、例えば放射性同位元素(RI)により標識化されたもの、例えばビオチン、ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体等の蛍光、発光または発色を誘発するのに必要な

酵素や化合物などの非放射性標識物質 (non R I) で標識化されたものなどが利用できる。

ヌクレオチド鎖形成用の酵素としては、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I、DNA ポリメラーゼ I のクレノー断片、T. DNA ポリメラーゼ等の各種 DNA のポリメラーゼや逆転写酵素などが利用できる。

本発明における標識化は、ハイブリッドが固定化用核酸を介して固相に固定化された状態で行なうことができる。標識化過程を導入する時期としては、被検出核酸とプローブ核酸とがハイブリッドを形成した後に行なうのがよい。

また、この方法によれば、ハイブリッドを形成していない核酸には、新たな二本鎖部分形成のためのプライマーとして機能する部分及び伸展部分形成用の鋳型となる部分が存在しないので、上記の標識物質を取り込む二本鎖化反応が生じない。

なお、標識化の反応終了後に、標識化されたハイブリッドと、ハイブリッドに取り込まれなかった標識との分離は、例えば以下のような方法によ

り行なうことができる。

なお、本発明の方法においては、固相に固定されたハイブリッドのプローブ核酸と固定化用核酸との結合部を解離させて得られる固定化用核酸が結合した固相は、次の検出反応に繰返し再利用可能である。その際、B 部分を再利用する固定化用核酸に対して共通に形成し、A 部分を被検出核酸に応じて異ならせた複数種のプローブ核酸を用いれば、固相に固定された固定化用核酸を異なる被検出核酸の検出に繰返し再利用できる。

また、本発明の方法において、ハイブリッドに取り込まれた標識の量を測定することにより、被検出核酸の定量を行なうことができる。

(実施例)

プラスミド pUC19 の塩基配列の一部をもつ遺伝子検出を行った。

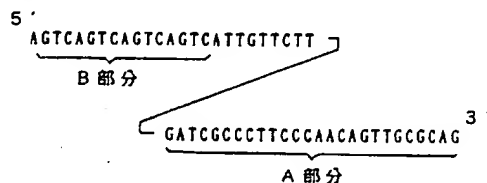
プラスミド pUC19 の塩基配列の一部に対応する A 部分と後に述べる固定化用核酸に対して相補的な塩基配列をもつ B 部分、及びその間に A と B との距離を保つ塩基配列をもった下記の構成の

り行なうことができる。すなわち固定化用核酸を介して固相に固定されたプローブ核酸と試料の間にハイブリッドが形成された場合には、ハイブリッドも固相に固定化されている状態となる。その状態で洗浄し、ハイブリッドに取り込まれなかった標識を洗い出して除去する。

また、試料、プローブ核酸及び固定化用核酸の反応順序を前述のように種々変更した場合でも、最終的に固定化用核酸を介したハイブリッドの固相への固定化状態を得た後、上述と同様の洗浄処理を行なってハイブリッドに取り込まれなかった標識を分離することができる。

ハイブリッドに取り込まれた標識の検出は、例えば第 2 図に示すように固相に固定化された状態のハイブリッドに取り込まれている標識を、該標識に応じた方法で検出する方法、固相に固定化されたハイブリッドの固定化用核酸とプローブ核酸との結合部を解離させ、固相から離された被検出核酸・プローブ核酸ハイブリッドに取り込まれている標識を該標識に応じた方法で検出方法等によ

オリゴヌクレオチドを DNA 合成装置 (Applied Biosystems 社、381 A 型) により合成しプローブ核酸 1 とした。



次に固定化用核酸調製用オリゴヌクレオチドとして、下記の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを DNA 合成装置で合成した。



これらの合成されたオリゴヌクレオチドの一部をサンプリングし、7 M 尿素を含む 20 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりその純度を調べた。その結果、95 % 以上の純度であったので、それ以上の精製を行わずに以下の反応に用いることにした。

更に、上述のようにして得た固定化用核酸調製

用オリゴヌクレオチドに以下の操作によりビオチンを導入して固定化用核酸を得た。

合成オリゴヌクレオチド $50 \mu\text{g}$ ($50 \mu\text{g}$)、混合試薬液 (0.45M カコジル酸カリウム、 0.12M Tris-OH pH 6.9、 3.3mM CoCl_2 、 0.33mM ジチオスレイトール) $100 \mu\text{g}$ 、 4.0mM ビオチン化UTP (BRL社製) $40 \mu\text{g}$ 、 1.0mM dTTP $1 \mu\text{g}$ 、 H_2O $100 \mu\text{g}$ および TdT $15 \mu\text{g}$ (約 90 unit) を混合し、 30°C で反応を行なった。10 分間経過後、 0.2M EDTA $4 \mu\text{g}$ を反応系に添加し、酵素反応を停止させ、更にフェノール処理、エタノール沈殿を行い得られた沈殿物を乾燥後 H_2O $100 \mu\text{g}$ に溶解した。

次に、試料としてプラスミド pUC19、pBR322 及びこれらの混合物 (1:1) を用意し、各試料を常法に従い EcoRI で消化してから得られた消化物を加熱処理して、二本鎖 DNA を一本鎖化し、各試料から得られた 3 種の一本鎖 DNA 混合物を個々に用いて以下の操作を行なっ

た。

3 図である。
反応後、この反応液をアガロースゲルを臭化シアンで活性化しアビジンを結合した固相と混合し、20 分間ゆっくり混和させた後、常温で強く遠心し上清を廃棄した。得られた沈殿物を TE 緩衝液で 2 度洗浄した後その放射線の計数をシンチレーションカウンターで数度測定したところ pUC19 及び pUC19 と pBR322 の混合物を用いた場合は 10^{-4}cpm の強度が計数され、pBR322 のみの試料におけるその値はバックグラウンドの 2 倍に満たなかった。

また、上記沈殿物を TE 緩衝液に加え、 80°C で 10 分間加熱を行なった後すばやく遠心し上清を廃棄した後、沈殿物を TE 緩衝液で洗浄して放射活性を測定した。その結果、沈殿物中に放射活性は計量されず、この加熱処理により標識を取り込んだ部分が解離されたことが確認された。

次に、この加熱処理後に得られた沈殿物を、上述と同様の操作に再利用したところ、良好な核酸の操作が行なえた。従って、該沈殿物はアビジン

た。

一本鎖 DNA 混合物 $20 \mu\text{g}$ と、先に調製した固定化用核酸 $2 \mu\text{g}$ 及びプローブ核酸 $2 \mu\text{g}$ を試験管に入れ 10X アニリング溶液 (100mM Tris-HCl pH 8.0、 60mM MgCl_2 、 60mM β -メルカプトエタノール、 500mM NaCl) を $10 \mu\text{g}$ を加え、更に蒸留水を加え全体が $100 \mu\text{g}$ になるように調製した。得られた溶液を 65°C まで加熱し、10 分間その温度を保った後約 1 時間かけてゆっくり室温まで冷ました。この時の反応状態を模式的に示したのが第 2 図である。

次に、得られた反応液 $100 \mu\text{g}$ に 10X アニリング溶液 $10 \mu\text{g}$ 、 1mM dATP、 1mM dCTP 及び 1mM dGTP を各 $10 \mu\text{g}$ 加えた後、 $\text{p}^{32}\text{-TTP}$ $100 \mu\text{g}$ を添加し、さらに蒸留水を加え全液量を $200 \mu\text{g}$ として標識化用の溶液を調製した。この溶液に DNA ポリメラーゼ I の Klenov 断片を 5 単位加水冷却下で 1 時間反応させた。この時の状態を模式的に示したのが第

3 図である。
反応後、この反応液をアガロースゲルを臭化シアンで活性化しアビジンを結合した固相と混合し、20 分間ゆっくり混和させた後、常温で強く遠心し上清を廃棄した。得られた沈殿物を TE 緩衝液で 2 度洗浄した後その放射線の計数をシンチレーションカウンターで数度測定したところ pUC19 及び pUC19 と pBR322 の混合物を用いた場合は 10^{-4}cpm の強度が計数され、pBR322 のみの試料におけるその値はバックグラウンドの 2 倍に満たなかった。

また、上記沈殿物を TE 緩衝液に加え、 80°C で 10 分間加熱を行なった後すばやく遠心し上清を廃棄した後、沈殿物を TE 緩衝液で洗浄して放射活性を測定した。その結果、沈殿物中に放射活性は計量されず、この加熱処理により標識を取り込んだ部分が解離されたことが確認された。

次に、この加熱処理後に得られた沈殿物を、上述と同様の操作に再利用したところ、良好な核酸の操作が行なえた。従って、該沈殿物はアビジン

た。
一本鎖 DNA 混合物 $20 \mu\text{g}$ と、先に調製した固定化用核酸 $2 \mu\text{g}$ 及びプローブ核酸 $2 \mu\text{g}$ を試験管に入れ 10X アニリング溶液 (100mM Tris-HCl pH 8.0、 60mM MgCl_2 、 60mM β -メルカプトエタノール、 500mM NaCl) を $10 \mu\text{g}$ を加え、更に蒸留水を加え全体が $100 \mu\text{g}$ になるように調製した。得られた溶液を 65°C まで加熱し、10 分間その温度を保った後約 1 時間かけてゆっくり室温まで冷ました。この時の反応状態を模式的に示したのが第

次に、得られた反応液 $100 \mu\text{g}$ に 10X アニリング溶液 $10 \mu\text{g}$ 、 1mM dATP、 1mM dCTP 及び 1mM dGTP を各 $10 \mu\text{g}$ 加えた後、 $\text{p}^{32}\text{-TTP}$ $100 \mu\text{g}$ を添加し、さらに蒸留水を加え全液量を $200 \mu\text{g}$ として標識化用の溶液を調製した。この溶液に DNA ポリメラーゼ I の Klenov 断片を 5 単位加水冷却下で 1 時間反応させた。この時の状態を模式的に示したのが第

また、本発明においては標識を取り込んだハイ

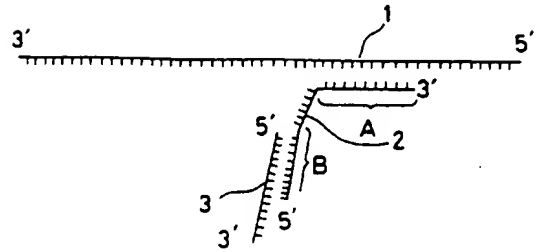
ブリッドと取り込まれなかった標識との分離が固相・液相間で精度良く行なわれるので、精度良い検出操作が可能となる。

更に、本発明においては、アビジン-ビオチン結合等を利用して固相に結合させた固定化用核酸は、プローブ核酸との解離処理を行なうことにより再利用可能である。従って、この固相に結合された固定化用核酸を利用することにより、新たな検出操作において化学的反応等を利用した固相への核酸の結合処理を省略でき、操作が極めて簡易化される。

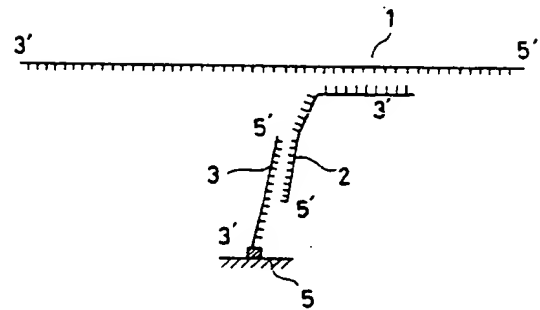
4. 図面の簡単な説明

第1図は被検出核酸・プローブ核酸・固定化用核酸ハイブリッドの構成を示す模式図、第2図は第1図で示したハイブリッドを固相に固定した状態を示す模式図、第3図は第2図で示した固定化ハイブリッド標識化の過程を示す模式図である。

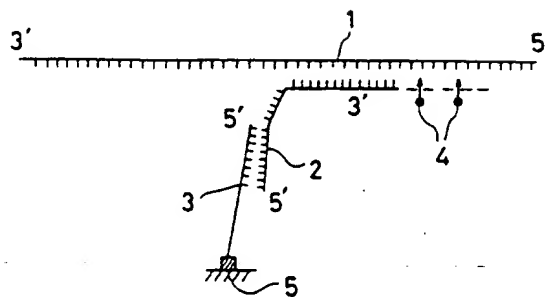
- 1 : 被検出核酸
- 2 : プローブ核酸
- 3 : 固定化用核酸
- 4 : 標識
- 5 : 固相



第 1 図



第 2 図



第 3 図